稻苗徒長病病原菌之有性世代[1]

張義璋[2]　　孫守恭[3]

摘要　由水稻徒長病病株上之 *Gibberella fujikuroi* 子囊胞子或分生胞子分離所得之單胞菌株，均有細長之鐮刀型大胞子及鏈生小胞子，爲典型之 *Fusarium moniliforme*，再由接種試驗確定各菌株均有高度病原性。

單胞菌株純培養時不能形成子囊殼。如果在單胞菌株中給以適當配對及適合培養基與環境，子囊殼即可發育形成。由隨機組合配對得知單子囊中 8 個子囊胞子分成兩種親和配對型 (A, a)，A 與 a 之比例爲 1 : 1。另由交互配對試驗測出各菌株尚有性因子存在，分別爲雄性菌株、雌性菌株或雌雄同體三種。臺灣各地區親和性之配對型菌株同時存在，故極易形成子囊殼，異絲生殖 (Heterothallism) 得以證明。

前　言

稻苗徒長病之文獻記載最早見於1828年，當時被認爲是生理病害。1898年堀正太郎研究確認爲眞菌類病原菌所引起，定名爲 *Fusarium heterosporium* Nees.。隨後藤黑氏在臺灣發現有性世代，並由澤田兼吉於1917年定名爲*Lisea fujikuroi* (16,23)。嗣後該菌學名經許多學者陸續研究與討論而互有變化 (16,21)。至1931年Wollenweber始更正其有性世代名稱爲 *Gibberella fujikuroi*，無性世代爲 *Fusarium moniliforme* Sheld，而延用至今 (11,16,19,20)。

稻苗徒長病病原菌之有性世代唯獨在臺灣易於形成，其他地區均不易發現。病菌之有性世代，無論在其本身之遺傳上及生態上均佔重要之角色。稻苗徒長病病菌之研究報告爲數雖然甚多，但大多爲研究其分泌物質激勃素 (Gibberellins)。對於其有性世代之研究黑澤英一 (22) 雖有初步之研究，但對於有性世代之配對因子則未深入探討。故本試驗乃針對該菌之親和配對因子加以研究。

材料與方法

一、供試菌株之來源

鑒於單胞分離所得之純菌株最爲可靠，故本試驗所用之菌株均來自單胞分離。子囊胞子之單胞分離係參考 Keitt 氏法 (6)；在解剖顯微鏡下將子囊胞子以纖細玻璃針分開，並挑取培養於 Potato—dextrose agar (PDA) 培養基上。分生胞子單胞分離，採用水瓊脂平板法 (17)。

本試驗中分別由子囊胞子及分生胞子共分出 186菌株，經接種試驗證實均有徒長之病原性，其中用於有性世代形成試驗者共35菌株，如表 1 所列。

表1.　菌株來源

菌株代號*	採集地點	採集時間	單胞來源	備註
ED—1, ED—2, ED—3 ED—4, ED—5, ED—6 ED—7, ED—8	屏東	9—17,1971	單子囊中之 8 個子囊胞子	

1.試驗報告農試字第七一一號　2.臺灣省農業試驗所技佐　3.國立中興大學教授

TRM：48—1, 48—2, 48—3 48—4, 48—5, 48—6 48—7	臺　中	6—26,1971	單子囊殼之分生胞子後代	
TRM：49, 50, 51, 52 53, 54, 55, 70	臺　中	6—27,1971	各不同時之子囊胞子	
TRM：91—1, 91—2 91—3, 91—5, 91—6	屏　東	5—20,1972	單子囊中之8個子囊胞子	91—4, 91—7, 91—8之胞子未發芽
TRM：93—1, 93—2 93—4, 93—5, 93—6, 93—7, 93—8	屏　東	5—20,1972	單子囊中之8個子囊胞子	93—3胞子未發芽

*. TRM 代號之菌株係由美國加州大學 Dr. W. C. Snyder 編號

二、供試菌株之培養及保存

Fusarium moniliforme 可培養及保存於 PDA 上，但該菌極易變異。爲避免其發生變異，野生型（Wild—type）菌株需經常更新培養（20～30天移殖一次）。每次更新培養均行單胞分離，使每一菌株後代僅含單一基因型（Genotype）。由此單一基因型發育之菌株，可保持本菌野生型之性狀[17]。

光線是本菌產生大胞子堆（Sporodochia）之必要條件。通常向北窗戶的間接日光爲最好的光源。但如果在距培養試管上面18吋處裝置2支 40W 的日光燈，亦可達到正常產胞之目的。雖光照可促進大胞子之產生，溫度更不可忽視，20°C～23°C 是生長及產胞的最適溫度[12,17,18]。

培養本菌時易遭蜱蝨爲害，它取食菌絲及胞子，且帶入雜菌。故培養試管均用香煙紙沾 40% Gelatin 加3%硫酸銅之混合物封口，阻斷蜱蝨之進入[13]。

三、實驗室中有性世代之形成

爲求證本菌是否爲異絲生殖（Heterothallism）及菌株間之配對型（Mating—type），培養材料以稻稈爲最佳。切取 5cm 長健全稻稈，置於 50ml 三角瓶中，每瓶3～4根，加 10ml 蒸餾水，高壓殺菌。冷却後以不同組合取兩個菌株混合接種稻稈上，培養於光照及 20°C～24°C 之溫度下。如果兩菌株互爲配對型，15天後可見未成熟子囊殼出現，20天後子囊殼逐一成熟。

爲瞭解配對菌株間之性別（Functional sexuality），則以含20%稻稈抽出液之 Sach's medium 高壓殺菌後，傾於平板時再加經 Propylene oxide 消毒之稻稈爲培養基[4,9,10]。取相互配對之菌株，做胞子懸浮液，分別倒入不同培養皿內，單獨培養一星期後，以相對菌株之菌絲及胞子懸浮液，接種其上。二十天後如有子囊殼形成，則先接種之菌株爲雌性，後接種者即爲雄性菌株。

四、稻株上子囊殼之形成

取配對親和之兩菌株，分別配製兩菌株之胞子懸浮液各 150ml（4.1×10^6胞子數/ml）。各取 50ml 混合。因此，即成單獨及混合之三種胞子懸浮液。將株高 15cm 之健全稻苗（約25天稻齡）洗淨，剪斷鬚根僅留 2～3cm 長。再將稻苗分成四組，分別以上述懸浮液及無菌水（對照）浸12小時。接種後直接種於花盆內，置室外維持正常生長至水稻成熟，隨時觀察其發病及病株上之分生胞子及子囊殼之產生。

試驗結果

一、各菌株之病原性

利用消毒過之臺中在來一號穀粒混以病原菌之胞子懸浮液接種後栽植在經流水漂洗12小時之砂上，測定菌株病原性。接種之水稻播種在15天後，徒長病徵最明顯，罹病株與田間病株相似。爲比較方便計，以徒長高度換算成徒長指數代表其病原性，結果如表2。由表2顯示大部份菌株具有强病原性，只有部份菌株因培養溫度偏高發生變異，病原性降低。

表2. 供試35菌株之病原性

徒長指數*	菌株代號	備註
101～120	TRM48—4, TRM48—5, TRM55	試驗進行中因培養溫度偏高（30°C 以上）致使部份菌株變異。病原性減弱。菌落則ED—3, ED—4, 48—5, 48—3, 48—1爲 Mycelium type, ED—6, 48—4, 53爲 Conidia type
121～140	TRM48—1, TRM48—7, TRM51, TRM52, TRM70	
141～160	ED—4, ED—6, TRM48—2, TRM48—3, TRM48—6 TRM49, TRM53	
161～180	ED—3, ED—7, ED—8, TRM93—1, TRM93—4 TRM93—6, TRM93—7, TRM91—2, TRM91—3	
181～200	ED—1, ED—2, ED—5, TRM—2, TRM93-5, TRM93-8, TRM91—1, TRM91—5, TRM91—6, TRM50, TRM54	

*徒長指數仍以對照爲 100，換算處理株之指數。即處理株指數＝$\frac{\text{處理株高}}{\text{對照株高}} \times 100$；例如對照稻苗平均株高爲 12cm，接種 TRM93—1 之稻苗平均株高爲 21.29cm，其徒長指數爲 $\frac{21.29\text{cm}}{12\text{cm}} \times 100 = 177.4$。

二、菌株間之親和性（Compatibility）

Fusarium moniliforme 之單子囊胞子或單分生胞子菌株單獨培養均不形成子囊殼。子囊殼必須兩菌株帶相對之親和性因子（A, a）（Compatibility factors）互相配對，方能形成。單一子囊分出之菌株，一半菌株帶 A 因子，另一半則帶 a 因子。同樣地，由分生胞子或不相關之子囊胞子分出之單胞菌株，帶 A 因子之菌株與帶 a 因子之菌株亦常以1：1之比存在（表3～表8）。

表3. 菌株93單子囊中各子囊胞子之配對型

（定93—1爲親和性因子A）

93		A	A	a	a	a	A	a
		1	2	4	5	6	7	8
A	1	－	－	－	＋	＋	－	＋
A	2	－	－	＋	＋	－	－	＋

表4. 菌株 ED 單子囊中各子囊胞子之配對型

（定ED—1爲親和性因子A）

ED		A	a	a	a	A	?	A	A
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	－	＋	＋	－	－	－	－	－
a	2	＋	－	－	－	＋	－	＋	＋

a	4	−	+	−	−	−	−	−
a	5	+	+	−	−	−	−	−
a	6	+	−	−	−	−	−	−
A	7	−	−	−	−	−	−	+
a	8	+	+	−	−	−	+	−

註:A, a 代表菌株間之兩親和性因子。+、−代表能形成子囊與否。

表 5. 菌株93及 ED 兩子囊間各胞子之配對型

（定93—1爲親和性因子A）

ED / 93		A	a	a	a	A	a	A	A
		1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	−	+	−	−	−	+	−	−
A	2	−	+	+	+	−	+	−	−
a	4	−	−	−	−	−	−	−	−
a	5	−	−	−	−	−	−	+	−
a	6	−	−	−	−	−	−	−	−
A	7	−	+	+	−	−	+	−	−
a	8	+	−	−	−	−	−	−	−

註：如表3註。

表 7. 91菌株單子囊內各子囊胞子之配對型

（定91—1爲親和性因子A）

91		A	A	A	a	a
		1	2	3	5	6
A	1	−	−	−	+	+
A	2	−	−	−	+	+
A	3	−	−	−	+	−
a	5	+	+	+	−	−
a	6	+	+	−	−	−

註：如表3註。

a	3	+	−	−	−	−	−	+	+
a	4	−	−	−	−	+	−	−	−
A	5	−	+	−	+	−	−	−	−
?	6	−	−	−	−	−	−	−	−
A	7	−	+	+	−	−	−	−	−
A	8	−	+	+	−	−	−	−	−

註：如表3註。

表 6. 48菌株中各分生胞子間之配對型

（定48—1爲親和性因子A）

48		A	a	A	A	a	a	A
		1	2	3	4	5	6	7
A	1	−	+	−	−	+	+	−
a	2	+	−	+	+	−	−	+
A	3	−	+	−	−	−	−	−
A	4	−	+	−	−	−	−	−
a	5	+	−	−	−	−	−	−
a	6	+	−	−	−	−	−	−
A	7	−	+	−	−	−	−	−

註：如表3註。

表 8. 菌株49至70間各不相關子囊胞子之配對型

（定49爲親和性因子A）

菌	株	A	a	a	a	A	A	a	A
		49	50	51	52	53	54	55	70
A	49	−	+	+	+	−	−	+	−
a	50	+	−	−	−	−	−	−	−
a	51	+	−	−	−	+	+	−	+
a	52	+	−	−	−	−	−	−	−
A	53	−	−	+	−	−	−	−	−
A	54	−	−	+	−	−	−	−	−
a	55	+	−	−	−	−	−	−	−
A	70	−	−	+	−	−	−	−	−

註：如表3註。

三、親和性菌株間之性別 (Functional sexuality)

利用不同時間先後配對培養 (Reciprocal crosses) 方法，得知前述35個菌株中有8個雌雄同株 (93～1，93～2，93～5，93～8，91～1，91～2，91～5，48～1)，10個雄性菌株 (93—7, ED—1, 93—6, ED—5, ED—8, 48—2, 48—5, 49, 51, 91—6)，10個雌性菌株 (ED—2, ED—3, ED—7, 48—3, 48—4, 48—6, 52, 54, 70, 91—3)，7個菌株未定出雌雄 (93—4, ED—4, ED—6, 48—7, 50, 53, 55) (表9～表12)。各個單胞菌株之交互配對，得知有三種親和性A→a, A←a, 及A⇄a，性別方面有兩性 (Hermaphrodite)，單雄性 (Unisexual male) 及單雌性 (Unisexual female)。

表 9. 菌株48各單胞後代之親和性因子及性別

48		⚥ A 1	♀ A 3	♀ A 4	A 7
♂ a	2	+−	+−	+−	−−
♂ a	5	+−	−−	−−	−−
♀ a	6	−+	−−	−−	−−

註：1.各菌株之親和性因子 (A, a) 係依據表3～表8所定。
2.每方格中左符號代表移左邊菌株胞子入右邊菌株之結果，右符號代表反向之結果。
3.十、一符號代表子囊殼形成與否。

表10. 菌株93及ED之各單胞後代親和性因子及性別

親和性 / 菌株 \ 配對		a 934	⚥ a 935	♂ a 936	⚥ a 938	♀ a ED2	♀ a ED3	a ED4	a ED6
⚥ A	93-1	−−	++	−+	−+	+−	−−	−−	−−
⚥ A	93-2	−−	+−	−−	−+	+−	−−	−−	−−
♂ A	93-7	−−	−−	−−	+−	−−	−−	−−	−−
♂ A	ED-1	−−	−−	−−	+−	+−	+−	−−	−−
♂ A	ED-5	−−	−−	−−	−−	+−	−−	−−	−−
♀ A	ED-7	−−	−+	−−	−−	−−	−−	−−	−−
♂ A	ED-8	−−	−−	−−	−−	−−	+−	−−	−−

註：如表9註。

表11. 菌株49至70之8菌株親和性因子及性別

親和性 / 菌株 \ 配對		♂ A 49	A 53	♀ A 54	♀ A 70
a	50	−−	−−	−−	−−
♂ a	51	−−	−−	+−	+−
♀ a	52	−+	−−	−−	−−
a	55	−−	−−	−−	−−

註：如表9註。

表12. 菌株91各單胞後代之親和性因子及性別

91		⚥ A 1	⚥ A 2	♀ A 3
⚥ a	5	++	++	+−
♂ a	6	+−	−−	−−

註：如表9註。

四、*Gibberella fujikuroi* 於病株上有性世代之形成

接種單一菌株之發病率及初期徒長病徵，雖與兩親和性菌株混合接種時相似，但前者不產生子囊殼，後者却可產生子囊殼於病株上（表13）。11個供試品種中，臺中在來1號、臺中秈2號、臺中155號、臺中186號及臺北306號等5個水稻品種均未感病枯死，亦無病菌出現。感病品種間發病率亦各有差異。各品種之對照均未發病。

表13. 親和性菌株混合接種之發病率及病徵之產生

水稻品種	接種菌株	發病率(%)	分生胞子*	子囊殼*
臺南5號	93—1	33.0	+	−
	93—5	25.0	+	−
	93—1+93—5	29.2	+	+
臺中178號	93—1	25.0	+	−
	93—5	25.0	+	−
	93—1+93—5	16.7	+	+
嘉農242號	93—1	37.5	+	−
	93—5	41.7	+	−
	93—1+93—5	45.8	+	+
新竹56號	93—1	25.0	+	−
	93—5	16.7	+	−
	93—1+93—5	20.8	+	+
臺中65號	93—1	8.3	+	−
	93—5	12.5	+	−
	93—1+93—5	16.7	+	+
臺北309號	93—1	16.7	+	−
	93—5	12.5	+	−
	93—1+93—5	20.8	+	+

*+、−符號代表病株上分生胞子或子囊殼之產生與否。

結論與討論

由水稻徒長病病株上之分生胞子或子囊胞子單胞分離之菌株，依其細長之鐮刀型大胞子，鏈生小胞子，及培養性狀等特性而知爲 *Fusarium moniliforme*。經病原性測定，野生型菌株均具有强烈之病原性，故均爲徒長病菌 [12,15,17,18]。

伊藤氏和木村氏，島田氏及 Stoll 等均謂 *F. moniliforme* 在人工培養基上，培養數月後即喪失病原性，雖接種水稻上，再行分離，亦無法恢復病原性 [16,20]。本試驗中亦有小部份菌株因培養溫度在 30°C 以上，而發生變異，隨之致病力亦有減弱之趨勢。同時發現，未行單胞更新培養之菌

株，其變異頻率頗高。如培養環境能予控制，在照光及低溫（20°C～23°C）下培養，另配合單胞更新移殖，雖經3年培養之菌株後代，尚保有野生型之特性及病原性不變。由此證明 *F. moniliforme* 之研究，溫度和光照之適宜為保存野生型菌株之必要條件。

稻苗徒長病病原菌（*Gibberella fujikuroi*）與*Venturia inaequalis*[6, 7, 8] 及 *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*[1, 2, 5, 14] 相似，由兩對因子控制有性世代之形成。其中一對因子控制兩菌株間之親和性，定為 A, a 因子。此對因子在減數分裂時自由分離並單獨遺傳。單價菌體只帶 A 因子或 a 因子。因此，形成自身不孕性（Self—sterile）。另一對因子控制性別，能形成子囊殼原始體（Perithecial primordia），或接受構造（Receptive structure）之菌株，具有雌性因子（Female factor）。能形成精子功能（Functional spermatia）之菌株，具有雄性因子（Male factor）。正常野生型菌株為雌雄同體（Hermaphrodites）。突變（Mutation）後可能形成雌性菌株、雄性菌株、或中性（Neuters）菌株。凡帶雌性因子之菌株經培養一段時間（約一星期後），即有子囊殼原始體產生。此時移入帶雄性因子並相互有親和性之菌株的胞子或菌絲，後者之胞子或菌絲中之核有精子功能而行受精作用（Fertilization），產生子囊殼[3]。本試驗已發現*G. fujikuroi* 有此現象存在。另外是否尚有輔助因子（Cofactors）或環境因子（如濕度等）能影響子囊殼之產生，則需做更進一步之探求。

臺灣田間徧存配對型之菌株，故極易發現子囊殼之形成。因本菌行異絲生殖，更增添本菌之變異性。對於其遺傳研究或抗病育種，以至於病原菌生態之研究，均不能加以忽視。

謝誌 本文係第一作者碩士論文之一部份，第二作者為指導教授。本研究進行中蒙行政院國家科學委員會及中國農村復興委員會之支持與經費補助。又美國加州大學教授 Dr. W. C. Snyder 曾數度來臺指導，得以順利完成。本稿蒙本所植物病理系主任杜金池博士校閱。併此謹申由衷謝忱。

參考文獻

1. El—Ani, Arif. S. 1954. The genetics of sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. Amer. J. Bot. 41：110—113.
2. Hansen, H. N., and W. C. Snyder. 1943. The dual phenomenon and sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. Amer. J. Bot 30：419—422.
3. Hansen, H. N., and W. C. Snyder. 1946. Inheritance of sex in fungi. Proc. Not. Acad. Sci. 32（10）：272—273.
4. Hansen, H. N., and W. C. Snyder. 1947. Gaseous sterilization of biological materials for use as culture media. Phytopathology 37：369—371.
5. Hirsch, H. E. 1949. The cytogenetics of sex in *Hypomyces solani* f. *cucurbitae*. Amer. J. Bot. 36：113—121.
6. Keitt, G. W. 1952. Inheritance of pathogenicity in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. The American Naturalist 136 (831)：373—390.
7. Keitt, G. W., C. C. Leben, and J. R. Shay. 1946. Inheritance of pathogenicity and sex reaction in *Venturia inaequalis* (abs.) Phytopathology 36：403.
8. Keitt, G. W., and D. H. Palmiter. 1938. Heterothallism and variability in *Venturia inaequalis*. Amer. J. Bot. 25：338—345.
9. Luttrell, E. S. 1958. The perfect stage of *Helminthosporium turicium*. Phytopathology 48：281～287.
10. Nelson, R. R. 1959. *Cochliobolus carbonum*, the perfect stage of *Helminthosporium carbonum*. Phytopathology 49：807—810.
11. Nishikado, Y., and H. Matsumoto. 1933. Weitere vergleichende untersuchungen über die durch

Lisea Fujikuroi Sawada und *Gibberella moniliformis* (Sh.) Wineland. Verursachten Gramineenkrankeiten.

12. Snyder, W. C. and H. N. Hansen. 1940. The effect of light on taxonomic characters in *Fusarium*. Mycologia 33 : 580—591.
13. Snyder, W. C. and H. N. Hansen. 1946. Control of culture mites by cigarette paper barries. Mycologia 38 : 455—462.
14. Snyder, W. C. and H. N. Hansen. 1954. Species concept genetics and pathogenicity in *Hypomyces solani*. Phytopathology 44 : 338—342.
15. Snyder, W. C. and T. A. Toussoun. 1965. Current status of taxonomy in *Fusarium* species and their perfect stages. Phytopathology 55 : 833—837.
16. Stowe, B. B. and T. Yamaki. 1957. The history and physiological action of the gibberellins. Annu. Rev. Plant Physio. 8 : 181—216.
17. Toussoun, T. A. and Paul E. Nelson. 1968. The pictorial guide to the identification of *Fusarium* species, 51p, The Pennsylvania State University Press. University Park and London.
18. Zachariah, A. T., H. N. Hansen, and W. C. Snyder. 1956. The influence of environmental factors on cultural characters of *Fusarium* species. Mycologia 48 : 459—467.
19. 伊藤誠哉。1932。水稲主要病害第一次發生と其の綜合防治法。北海道農事試驗場報第28號。201頁
20. 伊藤誠哉，木村甚彌。1931。稲馬鹿苗病に關する研究。北海道農事試驗場報告第27號。
21. 逸見武雄，瀬戸房太郎，池屋重吉。1932。稲開花期に於ける馬鹿苗病及び赤黴病の感染に就て（講要）。 日本植物病理學會報第２巻（５）468—470。
22. 黑澤英一。1934。稲馬鹿苗病菌並に類似菌に關する稲の徒長及び完全胞子に就て（講要）。 日本植物病理學會報３巻（１）：69—70。
23. 澤田兼吉。1919。臺灣産菌類調査報告第１編。臺灣總督府農事試驗場特別報告第19號，251～257。

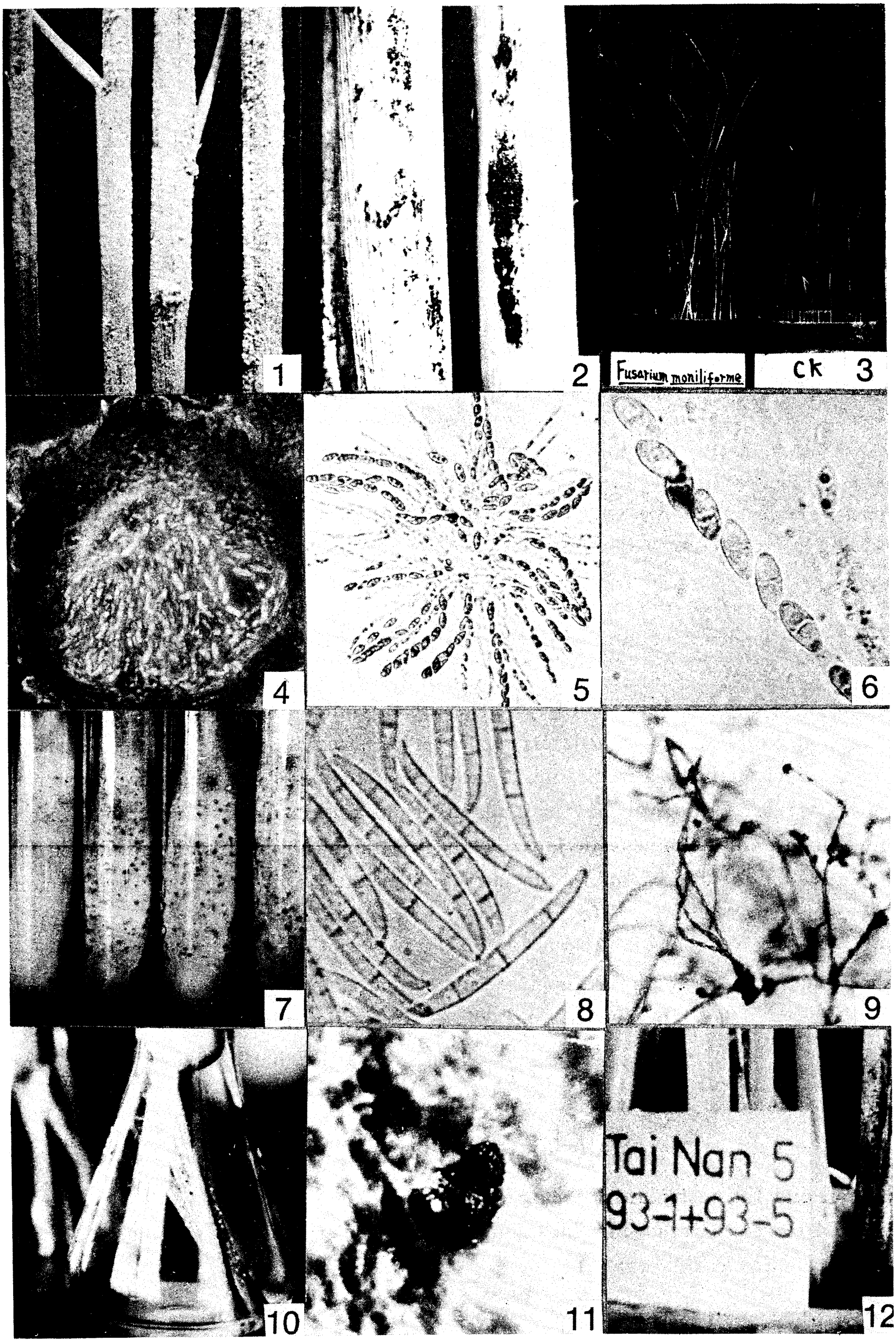
The perfect stage of *Fusarium moniliforme*

Yih—Chang Chang and Shou—Kung Sun

The cultures of *Gibberella fujikuroi* in this experiment were obtained by single—spore isolation from either perithecia or conidia. Each single ascospore or conidium culture produced the long and slightly curved macroconidia and chains of microconidia typical of *Fusarium moniliforme*. Pathogenicity tests comfirmed their caused relationship to disease.

Single ascospore or conidium culture did not produce perithecium in pure culture. However, when cultures on favorable medium [4, 9, 10] were mated under suitable culture condition [12, 17, 18], fertile perithecia did develop. When mating was made at random between the single ascospore cultures that were derived from the same ascus or the single conidium cultures, the isolates were about equally divided into 2 mating—types (A, a). From reciprocal crossing tests, the sexuality of tested isolates is known as female, male, or hermaphrodite, respectively.

Heterothallism, however, accounts for the wide genetic variability as recognized in *Fusarium moniliforme* that is isolated from rice plant.



圖版說明

1. *Gibberella fujikuroi* 在病株上產生之分生胞子及菌絲層。
2. *G. fujikuroi* 在病株上產生子囊殼。
3. *Fusarium moniliforme* 人工接種，具有强病原性。
4. *G. fujikuroi* 子囊殼縱切面。
5. *G. fujikuroi* 之子囊羣。
6. *G. fujikuroi* 子囊具8個子囊胞子。
7. *F. moniliforme* 野生型菌落及大胞子堆。
8. 菌株 ED—1 之大胞子。
9. *F. moniliforme* 具鏈生小胞子
10. *G. fujikuroi* 在稻稈培養基上形成子囊殼。
11. *G. fujikuroi* 在培養皿內形成之子囊殼。
12 兩親和性菌株於人工接種之病株上形成子囊殼。